

## 明 細 書

皮膚炎及び／又は脱毛の治療剤の評価方法、皮膚炎及び／又は脱毛の治療剤、トランスジェニックマウス

### 技術分野

本発明は、自己免疫性皮膚炎等に代表される皮膚症状や脱毛に対する、被験物の作用を調べることのできる評価方法に関する。

### 背景技術

近年、アトピー性皮膚炎を含む自己免疫皮膚炎における、インターロイキン-18（以下 IL-18 と記載する。）の果たす役割が注目されており、ケラチノサイトプロモーターの制御下にある IL-18 遺伝子を導入したトランスジェニックマウスが作成され、当該トランスジェニックマウスを用いて、炎症発生機構の解明が進められている。

特に、ケラチノサイトプロモーターの制御下にある IL-18 を皮膚に過剰発現させたトランスジェニックマウスを用いた最近の研究では、IL-18 がトリニトロクロロベンゼン（TNCB）等の起炎物の繰り返し投与によって誘発される接触性皮膚炎（遅延性アレルギーの一種と考えられる）の悪化に深く関与していることが明らかにされ、IL-18 の拮抗剤が新規皮膚炎治療薬の創出に繋がることが示唆されている。

川瀬 裕介，他 8 名，“IL-18 トランスジェニックマウスでは trinitrochlorobenzene 誘発接触性皮膚炎が増強される”，平成 13 年 9 月，日本研究皮膚科学会第 26 会年次学術大会・総会・プログラム、144 頁

本願発明者等は、新規皮膚炎治療薬のスクリーニングに、当該トランスジェニックマウスを用いることを企図したが、このスクリーニング方法は、起炎物の繰り返し投与（週一回・6 週間等の投与日数）が必要とされる為、時間がかかるうえ操作が煩雑であるなど実施しづらい面があった。

一方、IL-18 過剰発現と脱毛との関係については、未だ知られておらず、IL-18 遺伝子を導入したトランスジェニックマウスを、脱毛の評価等に用いることができるとは、全く考えられていなかった。

また、このトランスジェニックマウスで、皮膚炎や脱毛を予防・治療する物質を具体的にスクリーニングした例は報告されていなかった。

### 発明の開示

本発明者等は、ケラチノサイトプロモーターの制御下にある IL-18 遺伝子を導入したトランスジェニックマウスが、生後間もない時期に自然発症的な炎症のピークを迎えること、及び当該ピークが治まった後に、起炎物を一度投与するだけで、皮膚炎を発症することを見いだした。

また、本発明者等は、ケラチノサイトプロモーターの制御下にある IL-18 遺伝子を導入したトランスジェニックマウスが、15 週齢前後から脱毛を発症すること、及び当該トランスジェニックマウスを用いたスクリーニングによって得られた物質が、脱毛等の原因となる皮膚炎、毛包炎を予防・治療できることを見いだした。

本発明者等は、これらの知見に基づき、本発明に到達した。

従って、本発明の目的とするところは、自己免疫性皮膚炎等に代表される皮膚症状に対する、被験物の作用を、簡便かつ短期間で調べることのできる評価方法を提供すること、脱毛に対する被験物の作用を調べることのできる評価方法を提供すること、当該評価に用いることのできるトランスジェニックマウスを提供すること、並びに脱毛予防・治療剤を提供することにある。

本発明の目的は、ケラチノサイトプロモーターの制御下にある IL-18 遺伝子を導入したトランスジェニックマウスを用い、被験物の皮膚に与える影響を評価する方法であって、評価指標として下記の (A) 及び／又は (B) を用いることを特徴とする被験物の評価方法、自然発症皮膚炎が、生後 8～12 日目にピークを迎えるものであることを特徴とする、当該評価方法、及び評価目的が、自己免疫性皮膚炎の予防・治療剤のスクリーニングであることを特徴とする、当該評価方法によって達成される。

(A) 自然発症皮膚炎

(B) 起炎物初回投与時の皮膚炎症

本発明の目的は、NK1.1 抗原を有する細胞を抑制する物質を含むことを特徴とする皮膚炎の予防又は治療剤によって達成される。

また、本発明の目的は、NK1.1 抗原を有する細胞を抑制する物質を含むことを特徴とする脱毛の予防又は治療剤によって達成される。

また、本発明の目的は、被験物の脱毛に与える影響を評価するために用いられるトランスジェニックマウスであって、ケラチノサイトプロモーターの制御下にあるインターロイキン-18 遺伝子を導入したものであることを特徴とするトランスジェニックマウス、又は評価目的が、脱毛の予防又は治療剤のスクリーニングであることを特徴とする、当該トランスジェニックマウスによって達成される。

さらに、本発明の目的は、ケラチノサイトプロモーターの制御下にあるインターロイキン-18 遺伝子を導入したトランスジェニックマウスを用い、被験物の、脱毛に与える影響を評価する方法、又は評価目的が、脱毛の予防又は治

療剤のスクリーニングであることを特徴とする、当該評価方法によって達成される。

#### 図面の簡単な説明

【図 1】本発明で用いられる組換え遺伝子の一例である。

【図 2】Tg (+)マウスの脱毛発症率を示す図である。

【図 3】生後 10 日目で自然発症皮膚炎のピークを迎えた K5/IL-18 トランスジェニックマウスの皮膚の病理標本（生物の形態）を示す図面代用写真である。HE 染色（x 50 倍）

【図 4】(B) 起炎物初回投与時の皮膚炎症の発症を示す図である。

【図 5】Tg (+)マウスへの[A] コントロール抗体 rabbit IgG 投与群（参考例 1）の皮膚病理像である。HE 染色（x 200 倍）。

【図 6】Tg (+)マウスへの[B] 抗 AsialoGM1 抗体投与群（実施例 2）の皮膚病理像である。HE 染色（x 200 倍）。

【図 7】Tg (+)マウスへの[A] コントロール抗体 mouse IgG 投与群（参考例 2）の皮膚病理像である。HE 染色（x 200 倍）。

【図 8】Tg (+)マウスへの[C] 抗マウス CD4 抗体投与群（比較例 1）の皮膚病理像である。HE 染色（x 200 倍）。

【図 9】Tg (+)マウスへの[D] 抗マウス CD8 抗体投与群（比較例 2）の皮膚病理像である。HE 染色（x 200 倍）。

【図 10】Tg (+)マウスへの[B] 抗マウス NK1.1 抗体投与群（実施例 3）の皮膚病理像である。HE 染色（x 200 倍）。

【図 11】Tg (+)マウスへの[A] コントロール vehicle 投与群（参考例 3）の皮膚病理像である。HE 染色（x 200 倍）。

【図 12】Tg (+)マウスへの[B] Dexamethasone 投与群（比較例 3）の皮膚病理像である。HE 染色（x 200 倍）。

【図 13】Tg (+)マウスへの[A] コントロール vehicle 投与群（参考例 4）の皮膚病理像である。HE 染色（x 200 倍）。

【図 14】Tg (+)マウスへの[B] FK506 投与群（実施例 4）の皮膚病理像である。HE 染色（x 200 倍）。

【図 15】Tg (+)マウスへの[B] 抗 Ly49D 抗体投与群（実施例 5）の皮膚病理像である。HE 染色（x 200 倍）。

【図 16】9 月齢の雌 Tg (+)マウスの顔面の皮膚病理像である。HE 染色（x 200 倍）。

【図 17】9 月齢の雌 Tg (+)マウスの背中の皮膚病理像である。HE 染色（x 200 倍）。

【符号の説明】

hK 5 promoter : hK5 プロモーター  
 S P : シグナルペプチド  
 mature mIL-18 : 成熟マウス IL-18 遺伝子  
 p A : ポリ A 配列  
 K 5 T G : K5/IL-18 トランスジェニック B6 マウス  
 W T : ワイルドタイプ B6 マウス  
 K5/IL-18Tg : K5/IL-18 トランスジェニック B6 マウス  
 Ig/IL-18Tg : Ig/IL-18 トランスジェニック B6 マウス  
 T G : K5/IL-18Tg, 又は Ig/IL-18Tg  
 vehicle : アセトン／オリーブオイル (4 : 1, v/v)  
 croton oil : クロトンオイルの 2% (v/v) アセトン／オリーブオイル (4 : 1, v/v) 溶液

### 発明の実施するための最良の形態

#### 〈トランスジェニックマウス〉

本発明の評価方法で使用するトランスジェニックマウスは、例えば次のような方法で、作成することができる。

マウスは、例えば、C57BL/6N マウス (B6 マウス)、Balb/c マウス等が好ましく用いられ、中でも、B6 マウスが好ましい。

マウスに導入する組換遺伝子は、ケラチノサイトプロモーター及びその制御下にある IL-18 遺伝子を含むものである。

ケラチノサイトプロモーターとしては、ヒトケラチノサイト 5 プロモーター (以下、h K 5 プロモーターと記載する。) 等が挙げられる。

組換遺伝子には、このほか、導入遺伝子の細胞外への放出を促進するためのシグナルペプチド遺伝子や、発現遺伝子の釣り出し等に有用なポリ A 配列を導入することが好ましい。

シグナルペプチドとしては、例えばマウスの免疫グロブリン (以下 Ig と記載する。)  $\kappa$ -チェーン・シグナルペプチド等が挙げられる。

ポリ A 配列としては、牛由来のポリ A 配列等が挙げられる。

上記を含む組換遺伝子の作出方法としては、遺伝子組み換えの公知の方法を用いることができるが、例示すると、以下の通りである。

マウス Ig  $\kappa$ -チェーンの、V-J2-C 領域から取り出したシグナルペプチドと、マウスのプロ IL-18 c DNA を用い、シグナルペプチドを持つ成熟 IL-18 c DNA を、PCR 法によって取得する。

次に、pCR2.1 ベクターを用いてサブクローニングし、続いてヒト伸長因子 1  $\alpha$  のプロモーターと牛由来ポリ A を含む pcdEF3 ベクターで、サブクローニングされ、pEF-IL-18SP とする。

KpnI/BbsI の制限酵素切断部位で切断された、pEF-IL-18SP のDNAフラグメントは、ヒト K5 プロモーターを含む pBSK ベクターの NotI 部位において、サブクローニングする。

BssHII の制限酵素部位で切断することによって、直鎖状DNAフラグメント (K5/SP/IL-18/polyA) を得ることができる (図1)。

組換え遺伝子をマウスに導入する方法としては、公知の遺伝子導入方法を用いることができるが、例えば、マウスの受精卵に上述のようにして得られた組換え遺伝子を注入したマウスを、野生型のマウスと掛け合わせ、その子孫のうち、IL-18 を発現しているものを選別することで、行うことができる。選別する方法としては、尻尾のゲノムDNAを用いたPCR分析、血清中の成熟 IL-18 の ELISA 分析、皮膚の成熟 IL-18 のウェスタンブロッティング分析等が挙げられる。

また、このようにして得られたトランスジェニックマウスは、20週以降、毛包炎や慢性皮膚炎像が認められ、雌のほぼ全例と、雄の20～40%で、局所的な脱毛が発生することが、本発明者によって、初めて確認された (図2)。

従って、ケラチノサイトプロモーターの制御下にあるインターロイキン-18 遺伝子を導入したトランスジェニックマウスを用いることによって、被験物の、脱毛等の原因となる皮膚炎に与える影響を評価し、育毛剤、養毛剤等をスクリーニングすることが可能となる。

このように、ケラチノサイトプロモーターの制御下にあるインターロイキン-18 遺伝子を導入したトランスジェニックマウスが、被験物の、脱毛に与える影響を評価する方法に用いられるのは、初めてのことであり、本発明のトランスジェニックマウスは、被験物の脱毛に与える影響を評価するために用いられるトランスジェニックマウスとして、新規なものである。

#### 〈被験物の皮膚炎に与える影響の評価方法〉

本発明の、被験物の皮膚に与える影響の評価方法において、評価指標として用いられる現象は、以下の2つの炎症反応である。

(A) 自然発症皮膚炎

(B) 起炎物初回投与時の皮膚炎症

本発明の評価は、上記の (A)、(B) の2つの一方又は両方において、被験物の効果を確認することによって行われる。

(A) の自然発症皮膚炎とは、IL-18 導入マウスが生後約8～12日目にピークを迎え、およそ4週以降に消失する炎症で、本発明者らによって今回初めて確認された症状である。この炎症は、病理学的には、皮膚組織において、表皮肥厚、角質増殖、真皮内に好中球を含む炎症性細胞浸潤を認め、表皮基底部には軽度の海綿状態が存在し、表皮向性の好中球浸潤により角質内膿瘍形成が認められる (図3)。

従って、生後約8～12日間のこれらの症状確認を指標とすることで、従来に比べて極めて短期間で、被験物の炎症予防・治療効果を確認することができ、炎症治療・予防剤のスクリーニングを実施することが可能となる。

(B)の起炎物初回投与時の皮膚炎症とは、例えば自然発症皮膚炎のピーク後等に、自然発症皮膚炎のピーク残存中、或いは当該症状が一旦消失した後、起炎物を初めて投与した際に誘発される皮膚炎症のことである。

これら(A)、(B)の発症には、いずれもIL-18の過剰発現が関与しており、これらの症状は、従前報告された起炎物の6週間に亘る繰り返し投与に起因して発症する接触過敏症と、発症機構が共通していることが確認された。

従って、本発明の、(A)、(B)を指標とする評価方法は、接触過敏症の短期間・かつ簡便な評価方法としても、利用することが可能である。つまり、(A)を指標とすることによって、従来、一旦皮膚炎が治まった後、更に6週間に亘る起炎物の繰り返し投与という長期間を要していた接触過敏症の予防・治療薬のスクリーニングが、生後8～12日前後まで短縮される。また、(B)を指標とすることによって、(一旦皮膚炎が消失した後、例えばクロトンオイル等の起炎物で処理することにより惹起される皮膚炎を指標にして)簡便に被験物を評価することもできる。更に、これら(A)、(B)の双方を指標としてスクリーニングを行うこともできる。

本発明の評価方法は、自己免疫性皮膚炎の予防・治療剤のスクリーニング方法として実施することができる。スクリーニングは、例えば自然発症皮膚炎のピーク発生前、発生後のいずれかの段階において被験物を投与し、ピーク発生の有無、ピークの大きさ、ピーク消失の速さ等を、非投与マウス(コントロール)と比較する等の手順によって、行うことができる。

#### 〈被験物の脱毛に与える影響の評価方法〉

本発明の、被験物の脱毛に与える影響を評価する方法は、脱毛の予防・治療剤のスクリーニング方法として実施することができる。スクリーニングは、例えば脱毛発生前、発生後のいずれかの段階において被験物を投与し、ピーク発生の有無、ピークの大きさ、ピーク消失の速さ等を、非投与マウス(コントロール)と比較する等の手順によって、行うことができる。

#### 〈本発明の皮膚炎及び／又は脱毛の予防・治療剤〉

本発明の皮膚炎の予防又は治療剤、或いは脱毛の予防又は治療剤の有効成分は、NK1.1抗原を有する細胞を抑制する物質である。

NK1.1抗原を有する細胞としては、NK細胞やNKT細胞等が挙げられる。

本発明で用いられるNK1.1抗原を有する細胞を抑制する物質としては、抗NK細胞抗体や抗NKT細胞抗体等の、NK1.1抗原を有する細胞に対す

る抗体、soluble HLA-class I 蛋白、FK506等の免疫抑制剤、NKレセプターの下流に存在する DAP12, SHP 等のNK細胞のシグナルトランスダクションに関与する分子の阻害剤等が挙げられるが、NK1.1 抗原を有する細胞に対する抗体が好ましい。

NK1.1 抗原を有する細胞に対する抗体としては、一般には、(1) AsialoGM1 抗原を認識する抗体や、NK1.1 抗原を認識する抗体を含む抗 killer inhibitory receptor (KIR) 抗体等の、NK1.1 抗原を有する細胞を抑制する抗体の他、(2) NK細胞を活性化する抗体、(3) Ly49D 等のNK細胞を活性化する抗原に対する抗体 (抗 Ly49D 抗体) 等もあるが、本発明においては、(1) のNK細胞を抑制する抗体が好ましい。

本発明で用いられる、AsialoGM1 抗原を認識する抗体としては、モノクローナル、ポリクローナル、もしくはキメラ抗体やヒト化抗体のいずれであっても良い。

具体的には、例えばウサギに抗原分子として糖脂質であるアシアロGM1を免疫し、そのウサギから得た血清から取得することができる、ポリクローナル抗体の一種である抗 AsialoGM1 抗体があるが、ヒトの皮膚炎や脱毛を予防・治療する場合には、ヒト由来のアシアロGM1 抗原を免疫した抗体を使って、キメラ抗体やヒト化抗体にしたものが好ましい。

本発明で用いられる、NK1.1 抗原を認識する抗体としては、モノクローナル、ポリクローナル、もしくはキメラ抗体やヒト化抗体のいずれであっても良い。

具体的には、例えばマウスに抗原分子としてマウスNK細胞を免疫し、そのマウスから得たモノクローナル抗体であり、マウス NK1.1 抗原 (NKR-P1B, NKR-P1C) を認識する同種抗体である抗 NK1.1 抗体があるが (BD Bioscience Pharmingen Technical Data Sheet Catalog Number 553161, revision No. 011, 2002 年 10 月発行)、ヒトの皮膚炎や脱毛を予防・治療する場合には、ヒトNK細胞を免疫して得られたヒト NK1.1 抗原 (CD161) を認識する抗体を使って、キメラ抗体やヒト化抗体にしたものが好ましい。

本発明の皮膚炎の予防又は治療剤、あるいは脱毛の予防・治療剤は、注射等による全身投与の他、局部投与が挙げられるが、皮膚炎を発症し易い皮膚や頭皮等への局部に直接投与する局部投与が好ましい。全身投与の場合、静脈内への投与等が挙げられる。また、局部投与の場合、皮下または筋肉内への投与や、塗り薬や貼り薬 (パッチ) 等による、皮膚や頭皮への塗布等が挙げられる。

注射剤の調製は、常法によって行うことができる。即ち、注射剤の調製は、抗 AsialoGM1 抗体、抗NK1.1 抗体を、生理食塩液や、PBS等の緩衝溶液に溶解又は懸濁し、当該溶液を無菌的に凍結乾燥することによって行うことができる。

また、塗り薬や貼り薬の調製も、常法によって行うことができる。

剤形としては、クリーム、軟膏、乳液、エマルジョン、溶液、ゲル、パウダ

一、スティック等の固体、等が挙げられ、商品形態としては、パック、ローション（化粧水）、等の各種皮膚化粧料の他、シャンプー、リンス、トリートメント、育毛剤、養毛剤等の頭髮用化粧料等の形態とすることができる。

本発明の皮膚炎の予防又は治療剤、あるいは脱毛の予防・治療剤には、必要に応じて、適宜、安定化剤、防腐剤、無痛化剤など通常医薬品に添加される種々の助剤を加えることができる。

また、本発明の皮膚炎の予防又は治療剤、あるいは脱毛の予防・治療剤は、他の成分とともに、皮膚化粧料等の化粧料、医薬部外品、指定医薬部外品、外用医薬品等の原料として用いることができる。

他の成分としては、通常化粧料、医薬部外品、指定医薬部外品、外用医薬品等の原料として用いられているものであれば良い。

具体的には、例えば、陰イオン性界面活性剤、両性界面活性剤、非イオン性界面活性剤等の、界面活性剤、粘剤、油剤、粉体（顔料、色素、樹脂）、防腐剤、香料、保湿剤、生理活性成分、塩類、溶媒、酸化防止剤、キレート剤、パール化剤、中和剤、pH調整剤、昆虫忌避剤、酵素等の成分等が挙げられる。

これらの成分は、本発明の皮膚炎の予防又は治療剤、あるいは脱毛の予防・治療剤の効果を阻害しない範囲で、適宜、化粧料、医薬部外品、指定医薬部外品、外用医薬品等に含有させることができる。

また、本発明の皮膚炎の予防又は治療剤、あるいは脱毛予防又は治療剤は、ドラッグ・デリバリー・システム（DDS）を適用した製剤として用いることもできる。

投与量は、例えば患者の疾病、病態、投与経路、年齢、体重、有効成分の種類及び投与形態等によっても異なるが、成人1日当たり、通常、有効成分であるNK1.1抗原を有する細胞を抑制する物質の量として、0.001～10mg/kgを、1度にまたは2～3回に分けて投与する。尚、毎日投与しなくとも、数日間隔で投与してもよく、例えば1～4日毎に投与されても良い。

## 実 施 例

以下に実施例を上げて本発明を更に具体的に説明する。尚、評価方法の実施例に先立ち、(B) 起炎物初回投与時の皮膚炎症を、発症させる系（コントロール）を確立した。これは、本発明の被験物の皮膚に与える影響の評価方法において用いられる評価指標の一つである。

### (B) 起炎物初回投与時の皮膚炎症の発症

雄の、K5/IL-18 トランスジェニック B6 マウス（11 週令）、Ig/IL-18 トランスジェニック B6 マウス（10 - 12 週令）（T. Hoshino, J. Immunology, 2001, 7014-7018）及び当該週令の B6 マウス（ワイルドタイプ）の右の耳に夫々10 $\mu$ l のアセトン/オリーブオイル（4 : 1, v/v）にクロトンオイル



を 2% (v/v) 溶解させたクロトンオイル溶液を塗付し、左の耳に 10  $\mu$ l のアセトン/オリーブオイル (4 : 1, v/v) を塗付した。夫々、0、6、24、48 時間及び 7 日後に耳の厚さを計測した。

結果を図 4 に示した。

図 4 に示すとおり K5/IL-18 トランスジェニック B6 マウスにおいては 48 時間後まで有意な耳介の腫脹が認められた。一方、Ig/IL-18 トランスジェニック B6 マウスや、ワイルドタイプマウスでは、48 時間後には、耳介の腫脹は消失していた。

#### 実施例 1 (自己免疫性皮膚炎予防・治療剤のスクリーニング)

被験物 (予防・治療剤の候補化合物) をアセトン/オリーブオイル (4 : 1, v/v) 等の適当な溶剤 (左耳に塗布する溶剤と同じもの) に溶解又は懸濁させたものを、2% (v/v) クロトンオイル溶液塗布の前又は同時或いは塗布後に、適宜右の耳に塗付するほかは上記の (B) と同様にして処理し、24 時間後の耳介の腫れを計測し、コントロールの系との比較により、被験物による耳介の腫脹の抑制効果を判定する。

次に、本発明の皮膚炎の予防又は治療剤に関し、実施例を上げて更に具体的に説明する。尚、マウスは、5～7 匹を一群とし、各群ごとに、実施例、比較例、参考例等の被験物を投与した。

#### 実施例 2 (抗 AsialoGM1 抗体投与による皮膚炎抑制)

生後 1 日以内の K5/IL-18 Tg (IL-18 transgene (+); 以下、「Tg (+)」と記載する。) マウスに、PBS 0.1 mL に溶解した [A] コントロール抗体 rabbit IgG (Sigma) 2mg または [B] 抗 AsialoGM1 抗体 (Wako) 2mg を、腹腔内投与した。

抗体投与後 10 日後に、上記 A, B 2 群のマウスの、背中の皮膚を取り、20% ホルマリンで固定した。HE 染色にて皮膚炎を検討した。

抗体投与後 10 日後、外見の観察で、[A] 投与群 (参考例 1) では、皮膚炎が起こっていたのに対し、[B] 投与群 (実施例 2) では、皮膚炎が抑制されていることが認められた。

そして、これらの病理像を観察したところ、[A] 投与群 (参考例 1) では、Tg (+) マウスに角質肥厚、表皮の肥厚、真皮への好中球優位の侵潤がみられ、コントロール抗体 rabbit IgG では Tg (+) マウスの皮膚炎を抑制していないことが確認できた (図 5)。

一方、[B] 投与群 (実施例 2) では、角質肥厚、表皮の肥厚、真皮へのリンパ球侵潤の抑制がみられ、抗 AsialoGM1 抗体によって Tg (+) マウスの皮膚炎が抑制されることが確認できた (図 6)。

この結果、抗 AsialoGM1 抗体は、皮膚炎の予防・治療剤として有効であり、更には皮膚炎が原因で起こる脱毛の予防・治療剤としても有効であることが分かった。

#### 実施例 3、比較例 1～2 (抗 NK1.1 抗体投与による皮膚炎抑制)

生後1日以内のTg (+)マウスに、PBS 50 マイクロ L に溶解した[A]コントロール抗体 mouse IgG (Sigma) 0.5mg、[B]抗マウス NK1.1 抗体(PK136) 0.5 mg、[C]抗マウス CD4 抗体(GK1.5) 0.5 mg、[D]抗マウス CD8 抗体 (2.43) 0.5 mg を、腹腔内投与した。

抗体投与後10日後に、上記A-D4群のマウスの、背中の皮膚を取り、20%ホルマリンで固定した。HE染色にて皮膚炎を検討した。

抗体投与後10日後、外見の観察で、[A]投与群(参考例2)、[C]投与群(比較例1)及び[D]投与群(比較例2)では、皮膚炎が起こっていたのに対し、[B]投与群(実施例3)では、皮膚炎が抑制されていることが認められた。

そして、これらの病理像を観察したところ、[A]投与群(参考例2)では、Tg(+)マウスに角質肥厚、表皮の肥厚、真皮への好中球優位の侵潤と角質部(corneum)に微少膿瘍がみられ、コントロール抗体 mouse IgG では、抑制していないことが確認できた(図7)。

また、[C]投与群(比較例1)では、Tg(+)マウスに角質肥厚、表皮の肥厚、真皮への好中球優位の侵潤と角質部(corneum)に微少膿瘍がみられ、むしろ[A]投与群よりも、悪化の傾向が見られ、抗CD4抗体はマウスの皮膚炎を抑制しないことが確認できた(図8)。また、[D]投与群(比較例2)でも、Tg(+)マウスに角質肥厚、表皮の肥厚、真皮への好中球優位の侵潤と角質部(corneum)に微少膿瘍がみられた(図9)。

一方、[B]投与群(実施例3)では、角質肥厚、表皮の肥厚、真皮へのリンパ球侵潤等について、抑制がみられ、抗NK1.1抗体によって、Tg(+)マウスの皮膚炎が著明に抑制されていることが、確認できた(実施例3：図10)。

この結果、抗NK1.1抗体は、皮膚炎の予防・治療剤として有効であり、更には皮膚炎が原因で起こる脱毛の予防・治療剤としても有効であることが分かった。

#### 比較例3 (ステロイド・Dexamethasone 投与による皮膚炎抑制)

生後3日のTg (+)マウスに、[A] 0.5% CMC-Na/PBS (関東化学、カタログ番号37140-02) 100 マイクロ L のみ(vehicle)もしくは[B]0.5% CMC-Na/PBS 100 マイクロ L に溶解した1% Dexamethasone (10 mg/mL)を、連日7日マウスの背中の皮膚に塗布した。

初回投与から7日後(つまり最終投与の1日後で生後10日後)に上記2群マウスの背中の皮膚を取り 20%ホルマリンで固定した。HE染色にて皮膚炎を検討した。

Dexamethasone 塗布後8日後、外見の観察で、[A]投与群(参考例3)では、皮膚炎が起こっていたのに対し、[B]投与群(比較例3)では、皮膚炎が抑制されていることが認められた。

そして、これらの病理像を観察したところ、[A]投与群(参考例3)では、Tg(+)マウスに角質肥厚、表皮の肥厚、真皮への好中球優位の侵潤と角質部

(corneum)に微少膿瘍がみられ、vehicle では Tg(+)マウスの皮膚炎を抑制しないことが確認できた(図11)。

一方、[B]投与群(比較例3)では、角質肥厚、表皮の肥厚、真皮へのリンパ球浸潤の抑制がみられ、皮膚炎が有る程度抑制されていることが確認できた(図12)。しかしながら、抑制効果は実施例2の抗NK1.1抗体ほど強くなく、特に角質肥厚はほとんど抑制していなかった。また、[B]のDexamethasone 塗布群の約半数が、副作用のため死亡した。

この結果から、ステロイド剤によって、皮膚炎は有る程度抑制されるものの、副作用が強く、実用上問題があることが確認された。

#### 実施例4、参考例4 (FK506投与による皮膚炎抑制)

生後3日のTg(+)マウスを用いた。0.5% [A] CMC-Na/PBS (関東化学、カタログ番号37140-02) 100  $\mu$ Lのみ(vehicle), もしくは [B] 0.5% CMC-Na/PBS 100  $\mu$ Lに溶解した1% FK506(10 mg/mL, 藤沢薬品より供与)を、連日7日マウスの背中の皮膚に塗布した。初回投与から7日後(つまり最終投与の1日後で生後10日後)に上記2群マウスの背中の皮膚を取り20%ホルマリンで固定した。HE染色にて皮膚炎を検討した。

FK506 塗布の 初回投与から7日後(つまり最終投与の1日後で生後10日後)、外見の観察で、[A] 投与群(参考例4)では、皮膚炎が起こっていたのに対し、[B] 投与群(実施例4)では、皮膚炎が抑制されていることが判明できた認められた。

そして[B] 投与群(実施例4)は、[A] 投与群(参考例4)に比べて、病理学的にも炎症細胞の真皮への浸潤も抑制されていた(参考例4:図13/実施例4:図14)。

つまり、FK506 塗布によっても、抗AsialoGM1抗体(実施例2)や抗NK1.1抗体(実施例3)程ではないものの、皮膚炎が抑制されることが分かった。

#### 実施例5 (抗Ly49D抗体投与による皮膚炎抑制)

生後1日以内のTg(+)マウスを用いた。このTg(+)マウスに、PBS 50  $\mu$ Lに溶解した抗Ly49D抗体(4E6) 0.5mgを、腹腔内投与した。

抗体投与後10日後に、上記マウスの背中の皮膚を取り20%ホルマリンで固定。HE染色にて皮膚炎を検討した。

抗体投与後10日後、外見の観察で抗Ly49D抗体投与群では、皮膚炎が抑制されていることが認められた。

そして、これらの病理像を観察したところ、抗Ly49D抗体投与群では、Tg(+)マウスに角質肥厚、表皮の肥厚、真皮への好中球優位の浸潤と角質部(corneum)の膿瘍は、いずれも微少であった。(図15)

これらの結果から、本発明の皮膚炎や脱毛の予防・治療剤が、ステロイド剤よりも、脱毛の原因ともなる皮膚炎の抑制効果に優れているにも拘わらず、副作用もなく、極めて優れた予防・治療剤として有用であることが分かった。

## 試験例

以下の試験例により、皮膚炎が、脱毛に関係していることを確認した。前述の図2に示した通り、Tg (+)マウスでは、20週以降、毛包炎や慢性皮膚炎像が認められ、雌のほぼ全例と、雄の20～40%で、局所的な脱毛が発生することが、確認された。

また、9月齢の雌 Tg (+)マウスの皮膚の病理像を調べるため、顔面、背中の皮膚を取り、20%ホルマリンで固定し、HE 染色にて皮膚炎を検討したところ、毛根炎が起こっていることが確認された（顔面：図16，背中：図17）。

図16，図17の毛根炎は、いずれも、毛包周囲の強い炎症細胞浸潤（毛包周囲炎）と伴に、一部には毛包を形成する扁平上皮内にも炎症細胞浸潤を生じており、深在性の毛包炎であった。図16では、重度の皮膚炎のため皮膚の角質部分が欠損して潰瘍化している。図17では、毛根部に著明な炎症細胞浸潤、毛包炎を伴った脱毛と皮膚炎が生じている。

以上の結果から、本発明のトランスジェニックマウスは、被験物の脱毛に与える影響を評価するために使用できると考えられる。また、上記の結果からは、本発明の皮膚炎の予防又は治療剤によって、皮膚炎が抑制される結果、毛根炎も予防され、脱毛が予防されると考えられる。

## 産業上の利用可能性

本発明の評価方法によって、従来、起炎物の繰り返し投与のために更に6週間に亘る長期間を要していた、接触皮膚炎に対する被験物の評価が、生後約8～12日という短期間で、しかも起炎物の投与を一切行わないで評価することができる。あるいは、起炎物の繰り返し投与という面倒な作業を経ることなく、簡便に行うことができる。

また、本発明の皮膚炎の予防又は治療剤によって、脱毛，乾癬，自己免疫性疾患，アレルギー性皮膚炎等の皮膚炎を含む皮膚障害全般，これらの中でも、特に、IL-18の過剰発現に由来するものを、有効に治療・予防することができる。

また、本発明のトランスジェニックマウスによって、脱毛予防・治療剤のスクリーニングが可能となる。更に本発明の評価方法によって、被験物の脱毛に与える影響を調べることができる。

更に、本発明の皮膚炎又は脱毛の予防又は治療剤は、皮膚炎や脱毛の予防・治療に有効であるほか、ステロイド等のホルモン剤に比べて、安全性が高いという利点を有している。

## 特許請求の範囲

【請求項 1】 ケラチノサイトプロモーターの制御下にあるインターロイキン-18 遺伝子を導入したトランスジェニックマウスを用い、被験物の皮膚に与える影響を評価する方法であって、評価指標として下記の (A) 及び／又は (B) を用いることを特徴とする被験物の評価方法。

(A) 自然発症皮膚炎

(B) 起炎物初回投与時の皮膚炎症

【請求項 2】 自然発症皮膚炎が、生後 8 ～ 12 日目にピークを迎えるものであることを特徴とする、請求項 1 記載の評価方法。

【請求項 3】 評価目的が、自己免疫性皮膚炎の予防・治療剤のスクリーニングであることを特徴とする、請求項 1 に記載の評価方法。

【請求項 4】 評価目的が、自己免疫性皮膚炎の予防・治療剤のスクリーニングであることを特徴とする、請求項 2 に記載の評価方法。

【請求項 5】 ケラチノサイトプロモーターの制御下にあるインターロイキン-18 遺伝子を導入したトランスジェニックマウスを用い、被験物の、脱毛に与える影響を評価する方法。

【請求項 6】 評価目的が、脱毛の予防又は治療剤のスクリーニングであることを特徴とする、請求項 5 に記載の評価方法。

【請求項 7】 NK1.1 抗原を有する細胞を抑制する物質を含むことを特徴とする、皮膚炎及び／又は脱毛の予防又は治療剤。

【請求項 8】 NK1.1 抗原を有する細胞を抑制する物質が、NK1.1 抗原を有する細胞に対する抗体であることを特徴とする、請求項 7 記載の皮膚炎及び／又は脱毛の予防又は治療剤。

【請求項 9】 NK1.1 抗原を有する細胞に対する抗体が、AsialoGM1 抗原を認識する抗体又はNK1.1 抗原を認識する抗体であることを特徴とする、請求項 8 記載の皮膚炎及び／又は脱毛の予防又は治療剤。

【請求項 10】 被験物の脱毛に与える影響を評価するために用いられるトランスジェニックマウスであって、ケラチノサイトプロモーターの制御下にあるインターロイキン-18 遺伝子を導入したものであることを特徴とするトランスジェニックマウス。

【請求項 11】 評価目的が、脱毛の予防又は治療剤のスクリーニングであることを特徴とする、請求項 10 に記載のトランスジェニックマウス。

## 要 約

ケラチノサイトプロモーターの制御下にあるインターロイキン-18遺伝子を導入したトランスジェニックマウスを用い、被験物の脱毛に与える影響を評価する方法、又は当該マウスを使用し、評価指標として下記の（A）及び／又は（B）を用い、被験物の皮膚に与える影響を評価する方法。

（A）自然発症皮膚炎

（B）起炎物初回投与時の皮膚炎症

当該トランスジェニックマウスを用いて、自己免疫性皮膚炎等に代表される皮膚症状及び／又は脱毛に対する、被験物の作用を調べることができ、皮膚炎や脱毛予防・治療剤を提供することができる。